



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 35/74, 39/39, A61P 37/04, 35/00, C07K 14/26 // (A61K 35/74, 38:19)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/54790 (43) Date de publication internationale: 21 septembre 2000 (21.09.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00623 (22) Date de dépôt international: 15 mars 2000 (15.03.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/03154 15 mars 1999 (15.03.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LIBON, Christine [FR/FR]; 9, avenue de Ternier, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). CORVAIA, Nathalie [FR/FR]; 32, rue des Chênes, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève (FR). BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: IMMUNOSTIMULANT BACTERIAL MEMBRANE FRACTIONS IN CANCER TREATMENT (54) Titre: FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS (57) Abstract <p>The invention concerns the use of a membrane fraction of gram-negative bacteria, in particular <i>Klebsiella pneumoniae</i> for preparing a pharmaceutical composition that is immunostimulant and/or capable of inducing an antitumoral immune response, designed in particular for treating and preventing cancers. The invention further comprises methods for preparing said membrane fractions and pharmaceutical compositions containing them, in particular combined with anticancer compounds.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, destinée en particulier au traitement et à la prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anticancéreux.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS

5

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae* pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, destinée en particulier au traitement et à la
10 prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anticancéreux.

La transformation d'une cellule normale en cellule maligne est le résultat de nombreux événements différents, qui peuvent se produire spontanément, comme les
15 mutations ou les réarrangements de gènes, ou être induits par des agents chimiques, physiques ou viraux.

Les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunocompétentes, notamment des lymphocytes, des cellules dendritiques et des macrophages.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) proviennent de la circulation
20 sanguine et sont recrutés sur le site tumoral par des cytokines. Les TAM se lient aux cellules tumorales par l'intermédiaire de glycoprotéines, sucres et phospholipides, et prolifèrent au site tumoral (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583). Ils y sécrètent de nombreuses cytokines qui participent à leur activité antitumorale. Parmi les plus importantes, on trouve le TNF- α et l'IL-12.

25 L'activité antitumorale du TNF- α a été démontrée dans des modèles expérimentaux chez la souris (Beyaert R. and Fiers W., Cytokines, chapter 24, 335-360 Academic. Press. 1998) et a été testée chez l'homme pour traiter les cancers de la vessie : seul, il présente une activité modérée (Steinberg et al., Ann. Oncol., 1992, 3,741-745 ; Eur. Urol. 1992, 22:112).

30 La production d'IL-12 par des macrophages activés sert à moduler la réponse immunitaire en favorisant la formation de lymphocytes T CD4+ de type Th1, qui

produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ . L'activité inhibitrice de l'IL-12 sur l'angiogenèse et la régression tumorale est bien connue, et semble liée à l'induction d'IFN- γ qui stimule la production d'IP-10 (interferon-inducible protein-10) et de MIG (monokine induced by IFN- γ) (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583).

5 La thérapie à BCG (Bacille Calmette Guérin) est utilisée pour prévenir la récurrence de certains types de cancer de la vessie. Le mécanisme d'action proposé actuellement repose sur la production de cytokines : libération précoce de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), dans un deuxième temps production d'IL-2 et d'IFN- γ (réponse Th1), puis plus tardivement d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 (réponse
10 Th2). Enfin, se produit une phase d'activation cellulaire avec amplification de populations cytotoxiques (Patard et al., Progrès en Urologie, 1998, 8,415-421).

Cependant, la thérapie à BCG n'a pas que des avantages, car l'efficacité parfois observée l'est au prix d'une morbidité également supérieure. De plus, il existe des contre-indications à la BCG thérapie : tuberculose active (mais pas tuberculose
15 antérieure), immunosuppression (HIV, transplantation, ...), réaction systémique antérieure au BCG (hépatite, pneumonie, BCGite), traitements aux stéroïdes. Par ailleurs, il existe des résistances ou des récurrences après une thérapie à BCG.

La fraction membranaire de *K. pneumoniae* I145 entre dans la composition d'une préparation pharmaceutique prévenant la survenue et la récurrence d'infections
20 respiratoires d'origine bactérienne et utilisée chez l'homme depuis 20 ans. A ce titre, il existe un recul de non toxicité du produit. L'ensemble des données citées plus haut montre qu'il existe aujourd'hui un besoin de disposer de nouveaux immunostimulants dépourvus d'activité toxique. De tels immunostimulants seraient d'un grand intérêt pour le traitement de certains types de cancer.

25 De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont mis en évidence que des fractions membranaires d'une bactérie à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae* (dénommée FMKp), en particulier des fractions membranaires obtenues par les procédés tels que décrits ci-après dans les exemples, possèdent les propriétés immunostimulantes recherchées.

30 Les inventeurs ont montré de manière inattendue que la FMKp ou l'un de ses constituants majeurs, la protéine de membrane externe OmpA, dénommée P40 (telle

que décrite dans les demandes de brevets WO 95/27787 et WO 96/14415) était capable non seulement de stimuler la prolifération des cellules mononucléées du sang humain, démontrant ainsi son activité immunostimulante, mais également d'induire la production de TNF- α et d'IL-12, notamment par les monocytes, cytokines impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, comme composé immunostimulant et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, ou pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante, et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, et ce quel que soit le mode d'administration in vivo choisi (voie entérale ou parentérale).

Par composé ou composition pharmaceutique immunostimulante, on entend désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable d'augmenter une réponse immune non spécifique.

Par composé ou composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, on entend désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable en particulier d'accroître l'efficacité d'un composé anticancéreux ou d'accroître l'efficacité d'un traitement anticancéreux, tel que par exemple un traitement par radiothérapie.

L'invention concerne également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

Par fraction membranaire de bactérie, on entend désigner dans la présente invention toute fraction ou extrait membranaire purifié ou partiellement purifié obtenu à partir d'une culture de ladite bactérie et dont le procédé de préparation comprend au moins une étape de lyse des bactéries obtenues après culture et une étape de séparation de la fraction contenant les membranes desdites bactéries du lysat total obtenu après l'étape de lyse, notamment par centrifugation ou filtration.

Par fraction membranaire de bactérie lorsque ladite bactérie est *Klebsiella pneumoniae*, on entend désigner également dans la présente invention la protéine P40,

fraction active de la fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*, de séquence d'acides aminés SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.

Selon l'invention, les fractions membranaires pourront être préparées selon les méthodes connues de l'homme de l'art telles que par exemple la méthode décrite par
5 Haeuw J.F. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance
10 suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans
15 une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéolytiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- 20 f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

L'étape b) de désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a) peut être réalisée par toutes méthodes connues de désactivation d'enzymes, telles qu'en particulier par chauffage du culot bactérien remis en suspension à une température de préférence voisine de 100°C, ou par addition d'inhibiteur de l'activité
25 de ces enzymes.

L'étape c) d'extraction et d'élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) peut être réalisée par exemple par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction correspondant à l'addition d'une solution hypertonique (solution d'extraction), de préférence une
30 solution saline de molarité voisine de 1 M, suivie après un temps de contact suffisant pour l'effet désiré d'une centrifugation de la suspension obtenue et de l'élimination du

surnameant obtenu après ladite centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

L'étape d) de digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) peut être réalisée en présence d'une solution d'enzymes protéolytiques telles que par exemple la trypsine, la chymotrypsine ou toute enzyme à activité protéolytique connue, les conditions de la réaction, pH de la solution, température et durée de la réaction, étant de préférence ajustées aux conditions optimales pour l'activité de ou des enzymes choisies, suivie d'une centrifugation, ce cycle de digestion pouvant être reproduit plusieurs fois avec la même enzyme, la même combinaison d'enzymes ou avec une enzyme différente pour chaque cycle de digestion effectué.

L'étape e) de lavage du culot obtenu à l'étape d) est réalisée par reprise du culot dans une solution physiologique ou dans de l'eau distillée suivie, après un temps de contact suffisant, d'une centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

Enfin, l'étape f) d'ultrasonication du culot a pour objectif en particulier de désintégrer et d'homogénéiser la fraction membranaire obtenue en fin d'étape e). Les conditions d'ultrasonication (durée et puissance) seront déterminées par l'homme de l'art en fonction par exemple de la quantité de fraction membranaire à traiter.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;

- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 Les conditions de décongélation à l'étape b) du procédé ci-dessous seront bien entendu déterminées par l'homme de l'art en fonction de la quantité de culot initiale à traiter, de préférence réalisée à 4°C pendant au moins 48 heures pour l'équivalent de 1 Kg de cellules sèches.

A l'étape c), l'élimination des acides nucléiques est réalisée par exemple par
10 l'addition d'une DNase, à une concentration finale de 5 mg/ml d'une suspension de cellules à une concentration équivalente à 5 % de cellules sèches.

Le broyage des cellules obtenues à l'étape c) peut être réalisé au moyen de tout système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour le broyage de cellules tel que les presses ou de préférence tel que le broyage en boucle de Manton Gaulinet
15 pendant 30 minutes.

La clarification de la suspension obtenue après broyage pourra être réalisée au moyen de tout système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour la clarification de broyats cellulaires bactériens tel que le système Sharpless.

L'étape e) de précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d)
20 peut être réalisée par exemple avec l'acide acétique. La précipitation est suivie par l'élimination du culot au moyen par exemple d'un système de type Sharpless et par la récupération du surnageant.

L'étape f) consiste en une étape dans laquelle le surnageant, obtenu après précipitation en milieu acide, est neutralisé, dilué, dialysé puis concentré.

25 Enfin, la dernière étape consiste en une étape de stérilisation du concentré de fraction membranaire obtenu à l'étape précédente comme par exemple par chauffage à 121°C pendant environ 35 minutes.

L'invention concerne de manière particulière l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella*
30 *pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, l'un de ses fragments ou une protéine homologue dont la séquence présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de

préférence 90 %, 95 % et 99 %, avec la séquence SEQ ID N° 2, lesdits fragments ou ladite protéine homologue étant capables d'induire une activité immunostimulante et/ou antitumorale.

Par « pourcentage, degré ou taux d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total

de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences », disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les
5 paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap penaltie » : 5, et « extension gap penaltie » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

10 Par fragment de la protéine P40, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine P40 capable d'augmenter une réponse immune non spécifique et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, et comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au
15 moins 15 acides aminés.

Bien entendu, ladite protéine P40, ou ses fragments, pourront être obtenus par synthèse chimique ou sous forme de peptides recombinants.

Les méthodes de préparation de peptides recombinants sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.
20 Parmi les cellules utilisables pour la production de ces peptides recombinants, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542),
25 de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4, 558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for
30 the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4, 564-572).

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité à induire une réponse immunitaire antitumorale, telle que sous la forme d'une émulsion de type huile dans eau ou eau dans huile, ou sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires, on préfère les cytokines et les composés cellulaires.

Parmi les cytokines, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'IL-2, l'IL-12, l'IL-18, l'IFN- γ et l'IFN- α .

Parmi les composés cellulaires, on préfère notamment les acides nucléiques, les composés de la famille des ribosomes, ou encore les protéines de la famille des protéines de choc thermique.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent potentialisateur permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents potentialisateurs permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires, on préfère les hormones et les facteurs de croissance.

Parmi les hormones, on peut citer, mais sans s'y limiter la β -hCG.

Parmi les facteurs de croissance, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'EGF, l'IGF-1, l'IGF-2, le GM-CSF et le G-CSF.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux, notamment un traitement anticancéreux par chimiothérapie (mono ou polychimiothérapie) et/ou une radiothérapie.

5 Selon l'invention, la préparation de la composition pharmaceutique est destinée à être administrée, par voie entérale ou parentérale, simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique comprenant un composé à activité
10 anticancéreuse associé à ladite fraction membranaire.

De nombreux composés à activité anticancéreuse peuvent être ainsi associés à ladite fraction membranaire immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale.

Parmi ces composés, on peut citer notamment, mais sans s'y limiter, les
15 inhibiteurs de protéases ou les composés à activité anti-angiogénique, tels que par exemple :

- les inhibiteurs de protéases tels que les TIMPs ;

ou les composés à activité anti-angiogénique suivants : l'angiostatine, l'endostatine, MCP-1, IP-10 et PF-4 ainsi que des anticorps, des antisens ou des peptides anti-
20 VEGF, anti-angiogénine, anti-aFGF, anti-bFGF.

Ainsi, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, pour la
25 préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou le traitement des cancers, notamment les cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie, ou les mélanomes malins.

Sous un autre aspect, l'invention est relative à un procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*,
30 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- 5 c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- 10 e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

L'invention comprend aussi le procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*,
15 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- 20 c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- 25 f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

Les fractions membranaires susceptibles d'être obtenues par lesdits procédés
30 font bien entendu partie de l'invention.

Le titre en protéoglycane des fractions membranaires susceptibles d'être obtenues par lesdits procédés, principe actif de la FMKp, représenté par la somme des teneurs en galactose et en protéine, est de préférence compris :

- pour le galactose : entre 1,2 g/l et 3,4 g/l ;
- 5 - pour les protéines : entre 7,5 g/l et 14,9 g/l.

De manière plus préférée, ce titre sera :

- pour le galactose : entre 1,8 g/l et 2,6 g/l ;
- pour les protéines : entre 9,3 g/l et 11,7 g/l.

L'invention concerne en outre les compositions pharmaceutiques comprenant
10 une fraction membranaire susceptible d'être obtenue par les procédés selon l'invention.

Sont également comprises dans la présente invention, les compositions pharmaceutiques comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est associée à un
15 traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

On entend ici désigner par fraction membranaire, toute fraction membranaire de bactérie gram négatif telle que définie précédemment, dont celle susceptible d'être obtenue par les procédés selon l'invention et la protéine P40 ou l'un de ses fragments.

De façon préférée, l'invention concerne une composition pharmaceutique selon
20 l'invention, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, notamment un composé anticancéreux choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

De préférence, lesdites compositions pharmaceutiques selon l'invention,
25 pourront comprendre en outre des agents tels que les véhicules, agents capables de potentialiser et/ou de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires tels que définis précédemment.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer
30 l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figure 1 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp – Etude dose-réponse

Les cellules mononucléées (PBMC) sont obtenues par séparation à l'aide d'une solution de Ficoll-sodium métrizoate à partir du sang total. Les PBMC sont alors ensemencés à raison de 10 000 cellules/puits en présence d'agents stimulants, sous un volume total de 200 μ l. Après 72 h d'incubation, la prolifération est objectivée par addition de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en index de stimulation = [cpm PBMC + stimulus]/[cpm PBMC sans stimulus (= milieu RPMI + 10 % SVF)].

Figure 2 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp - Reproductibilité de l'effet sur plusieurs donneurs (FMKp à 250 μ g/ml).

Figure 3 : Production de TNF- α par des monocytes sanguins

Les monocytes sont cultivés en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 200 000 cellules/puits, 18 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) : kit Predicta de Genzyme (seuil de détection à 3 pg/ml).

Figure 4 : Production d'IL-12 p70 (biologiquement active) par des monocytes sanguins.

Les monocytes sont cultivés en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 500 000 cellules/puits, 24 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA : couple d'anticorps Endogen (seuil de détection à 15 pg/ml).

Exemple 1 : Obtention de la fraction membranaire de *K. pneumoniae* (FMKp)

Procédé N° 1

L'extraction des membranes de *K. pneumoniae* I145 à partir du culot de centrifugation de l'étape est précédée de préférence par une étape de destruction des enzymes lytiques des composants cellulaires contenus dans le culot, par exemple par chauffage à 100°C de celui-ci, éventuellement après remise en solution.

5 L'extraction proprement dite des membranes à partir du culot de centrifugation est réalisée de préférence par traitement des composants cellulaires du culot, après une éventuelle destruction des enzymes lytiques, à l'aide d'une solution saline, par exemple du chlorure de sodium 1 M, une ou plusieurs fois, puis centrifugation, de préférence, à 20 000 g, de la suspension obtenue, le surnageant de cette
10 centrifugation, qui est éliminé, contient les impuretés non membranaires telles que protéines et acides nucléiques, tandis que le culot contient les membranes.

Après séparation de la solution saline contenant les impuretés, les membranes sont digérées en présence d'enzymes protéolytiques, de préférence la trypsine et la chymotrypsine, en solution à pH 8 à 37°C pendant 4 heures.

15 Après digestion, la solution est homogénéisée par ultrasonication. Le produit ainsi obtenu constitue la fraction membranaire nommée FMKp.

Le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, de préférence à 140 000 g.

Préparation des glycopeptides membranaires

20 Cette fraction est préparée à partir du culot obtenu par centrifugation à 40 000 g pendant 20 minutes. Ledit culot est remis en suspension dans du sérum physiologique puis cette suspension est portée pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie d'eau bouillante pour désactiver les enzymes lytiques. Après refroidissement, on centrifuge 30 mn à 20 000 g. Le culot obtenu est extrait deux fois
25 avec du NaCl 1M pour éliminer les protéines et les acides nucléiques. Les membranes sont recueillies par centrifugation durant 30 minutes à 20 000 g.

Elles sont ensuite soumises à une digestion par de la trypsine à pH 8 et à 37°C pendant 4 heures puis par de la chymotrypsine dans les mêmes conditions.

30 Les membranes sont alors recueillies par centrifugation à 2 000 g pendant 30 minutes, lavées avec du sérum physiologique puis de l'eau distillée et sont soumises à une désintégration par les ultrasons de 15 minutes.

Procédé N° 2

Après décongélation à + 4°C pendant 48 h minimum, 1 kg de cellules sèches de *K. pneumoniae* est remis en suspension à 5 % cellules sèches. La DNase est ajoutée à 5 mg/l. On procède ensuite au broyage en boucle au Manton Gaulin pendant 5 30 min puis à une clarification sur SHARPLES à 50 l/h, suivie d'une précipitation à l'acide acétique à pH = 4,2 + 0,1 pendant 30 min. Le culot est éliminé (SHARPLES à 25 l/h) et le surnageant est neutralisé, dilué à 2 fois le volume initial avec de l'eau osmosée. Une dialyse à volume constant est alors effectuée sur PUF 100 jusqu'à 800 Ω cm, suivie d'une concentration de la suspension membranaire (SM) ainsi 10 obtenue, à 11 l/kg de cellules sèches. On procède alors à l'autoclavage de la SM à + 121°C durant 35 min que l'on peut conserver à + 4°C pendant 6 semaines.

Caractéristiques de la FMKp

Par définition, le titre en protéoglycane, principe actif de la FMKp, est égal à la somme des teneurs en galactose et en protéines.

- 15 - Galactose : en moyenne 2,2 g /l
- Protéines : en moyenne 10,5 g/l

Exemple 2 : Prolifération de PBMC du sang humain

Les résultats obtenus montrent que, de manière surprenante, la FMKp 20 déclenche la prolifération de PBMC. Cet effet est dose-dépendant et maximal pour 2,5 mg/ml de FMKp (figure 1). Par ailleurs, cet effet est reproductible (figure 2).

Exemple 3 : Production de cytokines par des monocytes purifiés du sang humain

Les monocytes humains sont obtenus à partir des cellules mononucléées 25 (lymphocytes, monocytes, cellules NK, ...) préalablement isolées du sang total humain. L'obtention des monocytes repose sur l'expression en grande quantité de l'antigène de surface CD14 sur ces cellules. La séparation est une sélection positive. L'efficacité de la séparation magnétique des monocytes est ensuite évaluée par cytométrie en flux en effectuant un marquage avec un anticorps CD13 couplé à la 30 fluorescéine iso-thiocyanate (FITC) : la suspension cellulaire contient alors 94 à 97 % de monocytes.

Les résultats d'études in vitro démontrent que, de manière intéressante, la FMKp est un immunostimulant qui induit la prolifération de PBMC du sang humain avec un effet direct sur les monocytes : production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4). Il est remarquable que la protéine P40 recombinante (rP40), l'OmpA de *K. pneumoniae*, est également capable de stimuler la production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4) par des monocytes humains.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.

3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;

- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
5 culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).
- 10 6/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments, ou une protéine dont la séquence présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2.
- 7/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que
15 la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité d'induire une réponse immunitaire antitumorale.
- 8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent
20 est de type émulsion huile dans eau ou eau dans huile.
- 9/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.
- 25 10/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.
- 11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent
30 permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est une cytokine.

12/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les hormones.

5 13/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les facteurs de croissance.

10 14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un composé cellulaire.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un acide nucléique choisi parmi les ADN et les ARN.

15 16/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un composé de la famille des ribosomes.

17/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est une protéine de la famille des protéines de choc thermique.

20 18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux.

19/ Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le traitement anticancéreux est une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

25 20/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

21/ Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie entérale ou parentérale.

30 22/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

23/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 22, pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

24/ Utilisation selon la revendication 23, pour la prévention et/ou le traitement des cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie et des mélanomes malins.

25/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 10 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 15 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

20 26/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- 25 c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
- 30 culot ;

f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 27/ Procédé selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce que ladite bactérie à gram négatif est *Klebsiella pneumoniae*.

 28/ Fraction membranaire susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 25 à 27.

10 29/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire selon la revendication 28.

 30/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, ou composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

15 31/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

 32/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit composé anticancéreux est choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou
20 parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

1/2

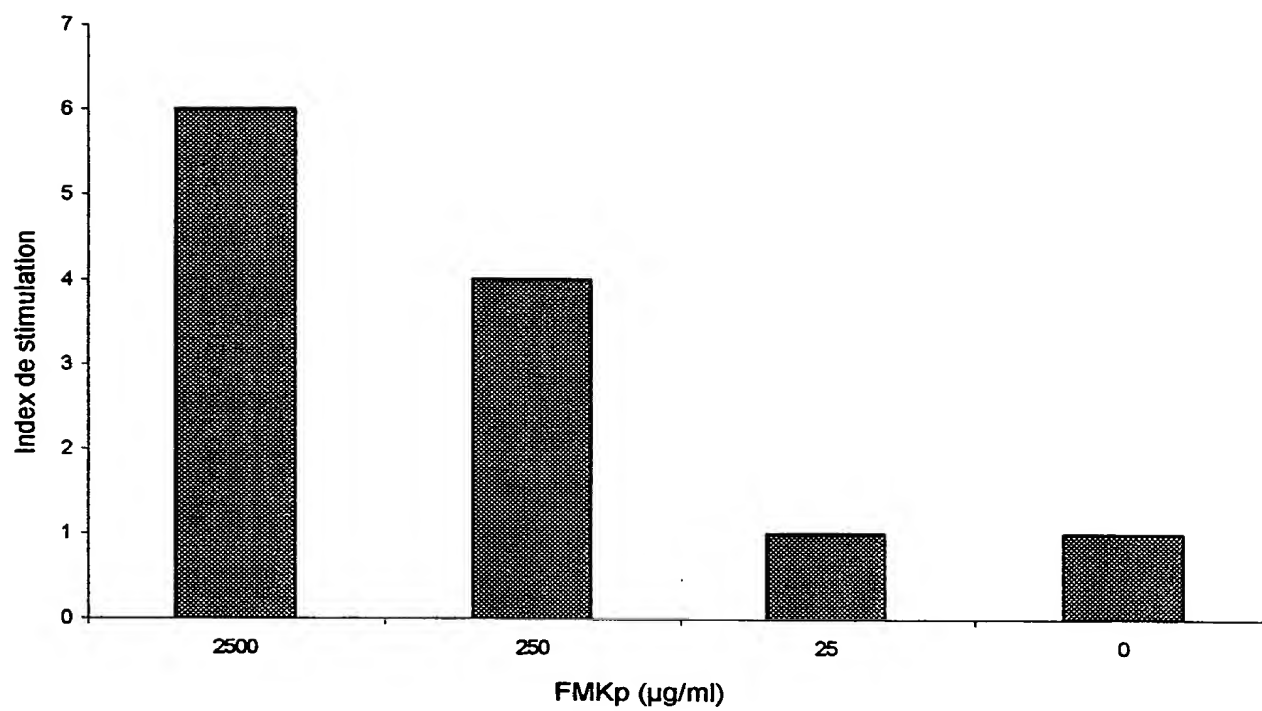


FIGURE 1

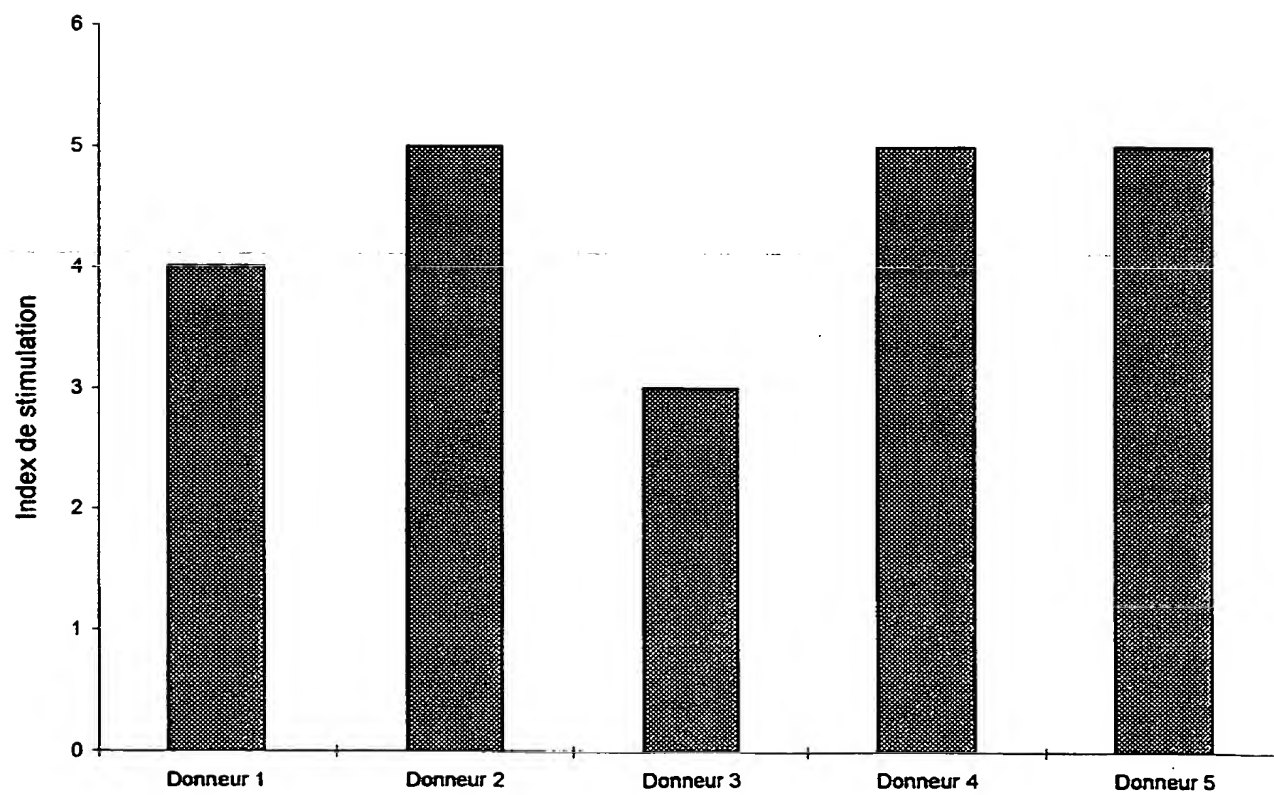


FIGURE 2

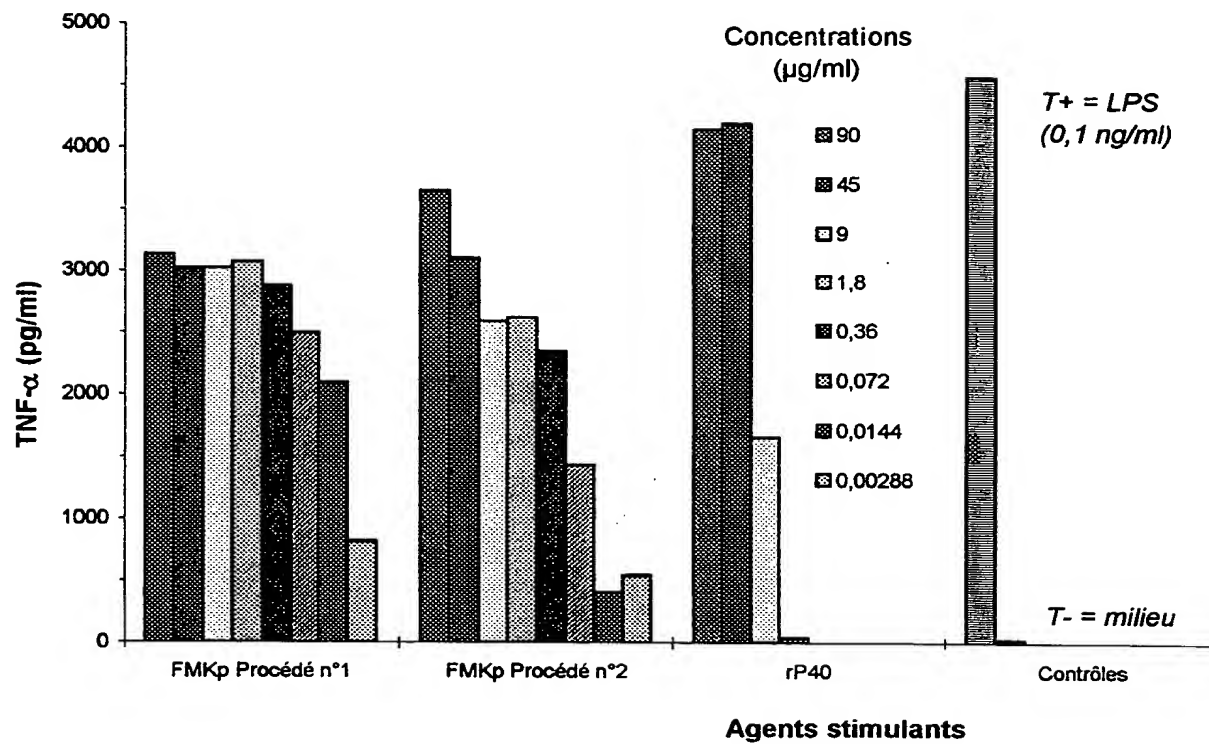


FIGURE 3

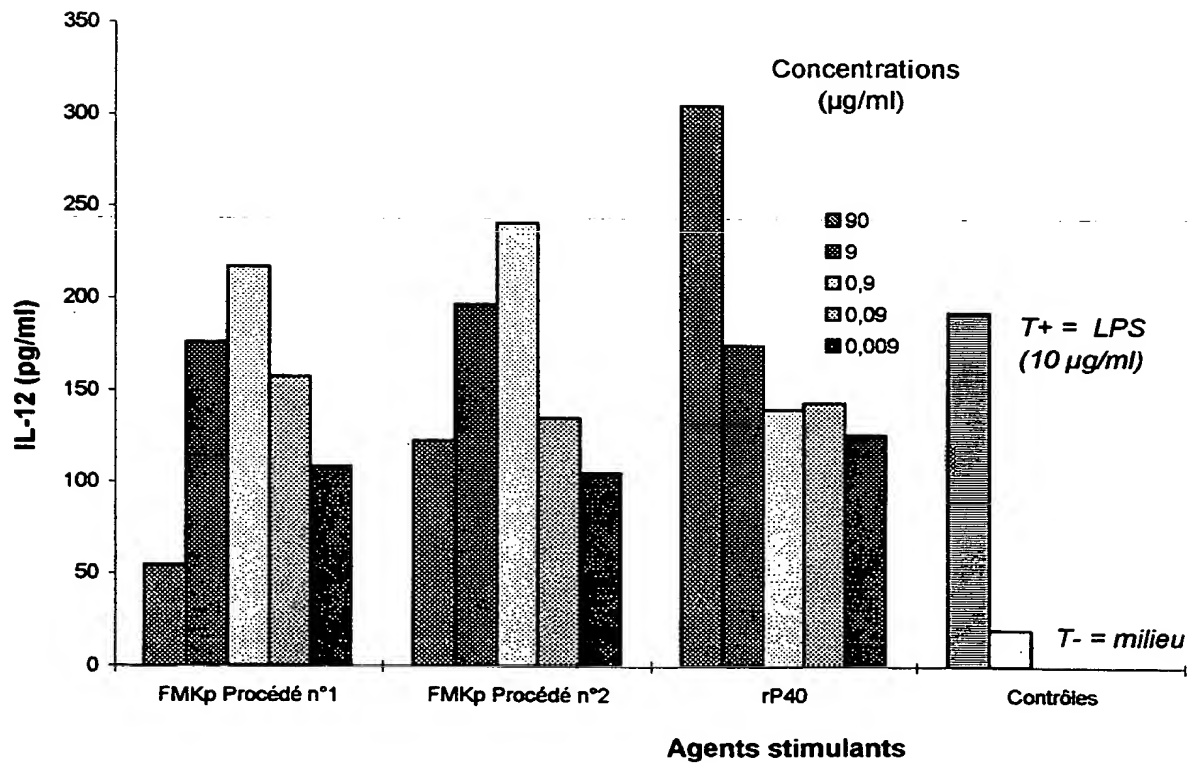


FIGURE 4

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> UTILISATION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES A
 ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE DANS LE TRAITEMENT DE
 CANCERS, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LES
 COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.

<130> D17974

<140> FR 99 03154

<141> 1999-03-15

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1035

<212> ADN

<213> Klebsiella pneumoniae

<220>

<221> exon

<222> (1)..(1032)

<220>

<221> intron

<222> (1033)..(1035)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<400> 1

```

atg aaa gca att ttc gta ctg aat gcg gct ccg aaa gat aac acc tgg      48
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
   1             5             10             15
tat gca ggt ggt aaa ctg ggt tgg tcc cag tat cac gac acc ggt ttc      96
Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
           20             25             30
tac ggt aac ggt ttc cag aac aac aac ggt ccg acc cgt aac gat cag      144
Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
           35             40             45
ctt ggt gct ggt gcg ttc ggt ggt tac cag gtt aac ccg tac ctc ggt      192
Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
           50             55             60
ttc gaa atg ggt tat gac tgg ctg ggc cgt atg gca tat aaa ggc agc      240

```


Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser		
65					70				75					80			
ggt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	ggt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288	
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys		
			85					90					95				
ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336	
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly		
			100					105					110				
ggc	atg	ggt	tgg	cgc	gct	gac	tcc	aaa	ggc	aac	tac	gct	tct	acc	ggc	384	
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly		
			115					120					125				
ggt	tcc	cgt	agc	gaa	cac	gac	act	ggc	ggt	tcc	cca	gta	ttt	gct	ggc	432	
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly		
			130					135					140				
ggc	gta	gag	tgg	gct	ggt	act	cgt	gac	atc	gct	acc	cgt	ctg	gaa	tac	480	
Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr		
			145					150					155		160		
cag	tgg	ggt	aac	aac	atc	ggc	gac	gcg	ggc	act	gtg	ggt	acc	cgt	cct	528	
Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro		
			165					170					175				
gat	aac	ggc	atg	ctg	agc	ctg	ggc	ggt	tcc	tac	cgc	ttc	ggt	cag	gaa	576	
Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu		
			180					185					190				
gat	gct	gca	ccg	ggt	ggt	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gaa	gtg	624	
Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val		
			195					200					205				
gct	acc	aag	cac	ttc	acc	ctg	aag	tct	gac	ggt	ctg	ttc	aac	ttc	aac	672	
Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn		
			210					215					220				
aaa	gct	acc	ctg	aaa	ccg	gaa	ggt	cag	cag	gct	ctg	gat	cag	ctg	tac	720	
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr		
			225					230					235		240		
act	cag	ctg	agc	aac	atg	gat	ccg	aaa	gac	ggt	tcc	gct	ggt	ggt	ctg	768	
Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu		
			245					250					255				
ggc	tac	acc	gac	cgc	atc	ggt	tcc	gaa	gct	tac	aac	cag	cag	ctg	tct	816	
Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser		
			260					265					270				
gag	aaa	cgt	gct	cag	tcc	ggt	ggt	gac	tac	ctg	ggt	gct	aaa	ggc	atc	864	

Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile		
275				280				285									
ccg	gct	ggc	aaa	atc	tcc	gct	cgc	ggc	atg	ggt	gaa	tcc	aac	ccg	gtt	912	
Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val		
290				295				300									
act	ggc	aac	acc	tgt	gac	aac	gtg	aaa	gct	cgc	gct	gcc	ctg	atc	gat	960	
Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp		
305				310				315				320					
tgc	ctg	gct	ccg	gat	cgt	cgt	gta	gag	atc	gaa	gtt	aaa	ggc	tac	aaa	1008	
Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys		
325				330				335									
gaa	gtt	gta	act	cag	ccg	gcg	ggc	taa								1035	
Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Gly										
340																	

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 2

Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln
		35					40					45			
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly
	50						55				60				
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser
65					70				75					80	
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys
				85					90					95	
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly
			100					105					110		
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly
		115					120					125			
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly
130						135					140				

Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175
 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190
 Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 195 200 205
 Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 210 215 220
 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser
 260 265 270
 Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 290 295 300
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320
 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 00/00623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
//(A61K35/74, 38:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 May 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; claims 1-6	1-3, 6-24, 28-32
X	FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 September 1987 (1987-09-25) page 2, line 8 - line 13; examples 1,3	1-3,5, 7-24, 26-32
A	FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 June 1981 (1981-06-26) the whole document	1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2000

Date of mailing of the international search report

14/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/00623

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ;YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 September 1991 (1991-09-05)	
E	WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ;AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 May 2000 (2000-05-18) page 5, line 8 - line 11 page 8, line 29 -page 9, line 14 claims 21-24	1-3, 6-24, 28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00623

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2726472 A	10-05-1996	AU 714423 B AU 4119996 A CA 2204510 A EP 0791063 A WO 9614415 A JP 10508595 T ZA 9509416 A	06-01-2000 31-05-1996 17-05-1996 27-08-1997 17-05-1996 25-08-1998 06-06-1996
FR 2596064 A	25-09-1987	AT 79037 T AU 7009387 A DE 3780843 A DE 3780843 T EP 0238407 A ES 2051759 T GR 3005567 T JP 1124396 A	15-08-1992 24-09-1987 10-09-1992 24-12-1992 23-09-1987 01-07-1994 07-06-1993 17-05-1989
FR 2471785 A	26-06-1981	AT 5797 T AU 538896 B AU 6558880 A CA 1181703 A DE 3066115 D EP 0031285 A ES 498476 D ES 8200229 A WO 8400688 A JP 56123918 A US 4389396 A ZA 8007985 A	15-01-1984 30-08-1984 25-06-1981 29-01-1985 16-02-1984 01-07-1981 16-11-1981 16-01-1982 01-03-1984 29-09-1981 21-06-1983 27-01-1982
WO 9112813 A	05-09-1991	AU 7477791 A	18-09-1991
WO 0027432 A	18-05-2000	FR 2785542 A	12-05-2000



10

11

12

13

14

15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No

PCT/FR 00/00623

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
 //(A61K35/74, 38:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; revendications 1-6	1-3, 6-24, 28-32
X	FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 septembre 1987 (1987-09-25) page 2, ligne 8 - ligne 13; exemples 1,3	1-3,5, 7-24, 26-32
A	FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 juin 1981 (1981-06-26) le document en entier	1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

A document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Form. Internationale No

PCT/FR 00/00623

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ;YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 septembre 1991 (1991-09-05)	
E	WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ;AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 mai 2000 (2000-05-18) page 5, ligne 8 - ligne 11 page 8, ligne 29 -page 9, ligne 14 revendications 21-24	1-3, 6-24, 28-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/00623

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2726472	A	10-05-1996	AU 714423 B	06-01-2000
			AU 4119996 A	31-05-1996
			CA 2204510 A	17-05-1996
			EP 0791063 A	27-08-1997
			WO 9614415 A	17-05-1996
			JP 10508595 T	25-08-1998
			ZA 9509416 A	06-06-1996
FR 2596064	A	25-09-1987	AT 79037 T	15-08-1992
			AU 7009387 A	24-09-1987
			DE 3780843 A	10-09-1992
			DE 3780843 T	24-12-1992
			EP 0238407 A	23-09-1987
			ES 2051759 T	01-07-1994
			GR 3005567 T	07-06-1993
			JP 1124396 A	17-05-1989
FR 2471785	A	26-06-1981	AT 5797 T	15-01-1984
			AU 538896 B	30-08-1984
			AU 6558880 A	25-06-1981
			CA 1181703 A	29-01-1985
			DE 3066115 D	16-02-1984
			EP 0031285 A	01-07-1981
			ES 498476 D	16-11-1981
			ES 8200229 A	16-01-1982
			WO 8400688 A	01-03-1984
			JP 56123918 A	29-09-1981
			US 4389396 A	21-06-1983
			ZA 8007985 A	27-01-1982
WO 9112813	A	05-09-1991	AU 7477791 A	18-09-1991
WO 0027432	A	18-05-2000	FR 2785542 A	12-05-2000



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

MARTIN, Jean-Jacques
MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Régimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

[stamp]

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)
31.05.2001

Applicant's or agent's file reference
340646/17974

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR00/00623

International filing date (day/month/year)
15/03/2000

Priority date (day/month/year)
15/03/1999

Applicant
PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide:

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: + 49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

Exner, K

Tel. +49 89 2399-7826



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 340646/17974	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00623	International filing date (day/month/year) 15/03/2000	Priority date (day/month/year) 15/03/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K35/74		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of 8 sheets including this title page.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 4 sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09/10/2000	Date of completion of this report 31.05.2001
Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Authorized officer: Didelon, F Telephone No. +49 89 2399 7332 <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> </div>

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-16 as originally filed

Claims, No.:

1-28 received with the fax of 16/03/2001

Drawings, sheets:

1/2,2/2 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is :

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00623

- ☐ the description, pages :
☐ the claims, Nos :
☐ the drawings, sheets/fig :

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	3-28
	No:	Claims	1, 2
Inventive Step	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-28
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-28
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

VIII. Certain observations in the international application

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00623

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

With regard to point VIII

Observations relating to the international application
(clarity)

1. Claim 1 lacks clarity within the meaning of article 6 of the PCT since it defines the use of the combination membrane fraction of Gram-negative bacteria, in particular *Klebsiella pneumoniae*, in terms of result sought ("immunostimulant", "capable of inducing antitumor immune response") and does not constitute a therapeutic indication (see Directives relating to the examination, C-III 4.7).

Conversely, the use of this membrane fraction should relate to a clearly delimited therapeutic application (for example as claimed in claims 22 and 23).

With regard to point V

Reasoned statement pursuant to rule 66.2(a)(ii) regarding novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such declaration

1. Preliminary comments:

The modifications filed with the fax dated March 16 2001 are admissible and do not extend beyond the application as filed.

These modifications include the characterization of the membrane fractions of Gram-negative bacteria, comprising proteoglycans. This characteristic was already present implicitly, it being clearly understood that fractionated bacterial membranes comprise such molecules. In addition, the present application does not in any way demonstrate that proteoglycans are the active compound for the immunostimulation. It appears

rather, according to the prior art, that the P40 protein is, itself, the immunostimulant.

2. Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 726 472 (PF MEDICAMENT) May 10, 1996
(1996-05-10)

D2: FR-A-2 471 785 (PF MEDICAMENT), December 21,
1979 (1979-12-21)

D3: FR-A-2 596 064 (PF MEDICAMENT) September 25,
1987 (1987-09-25)

3. The subject matter of claims 1 and 2 is not considered to be novel within the meaning of article 33(2) PCT.

3.1 Document D1 reveals that the OmpA protein P40 derived from membranes of bacteria of the Klebsiella genus acts alone as an immunostimulant agent, in particular causing a cellular immune response regarding Th1 lymphocytes and especially by activating macrophages (see D1, page 1, line 1-3; page 17, example 5, 1.b and 1.3; claims 1-6). In addition, this protein, in itself, constitutes a membrane fraction, which is also envisioned in the present application (see page 3, lines 29 - page 4, lines 1-2). Even though this protein is envisioned in D1 as an adjuvant, this takes nothing away from its immunostimulant effect as demonstrated in the example 5 cited.

In view of this disclosure, claims 1-2 do not therefore appear to be novel.

4. The subject matter of claims 1-28 does not involve an inventive step and does not satisfy the conditions of Article 33(3) PCT.



4.1 It is not clearly apparent which technical problem should properly be resolved by claim 3, which does not therefore appear to provide an inventive element.

4.2 Claims 4 and 5 are directed toward the use of membrane fractions obtained according to two different methods, and claims 25-27 seek to protect said methods.

However, this method used in claim 4 is a common method for isolating membranes which is used in the laboratory (centrifugation, heating, treatment with a proteolytic enzyme and then washes and, finally, sonication). This method is also described in D2 for extracting ribosomes (see page 2, line 19 - page 4, line 7).

Regarding the method used in claim 5, it has already been described in D3, example 1.

Consequently, a pharmaceutical composition or the use of a membrane fraction according to the methods described (claims 24, 25 and 3, 4, respectively) does not comprise an inventive step; since those skilled in the art were aware of these methods, they would have used them as an obvious alternative in order to obtain membrane fractions containing the P40 protein, which is responsible for the immunostimulant effect.

4.3 The agents which vehicule said membrane fraction or which regulate the immune response as claimed in claims 6-16 represent entirely obvious solutions aimed at better stability and improving the immunostimulant capacity of the preparation of the present application.



4.4 Claims 17-23 and 26-28 relate to the juxtaposition of an anticancer treatment, for the administration of the membrane fraction of the present application. This simply constitutes an additional conventional anticancer treatment, without any demonstrated synergistic effect (no example is provided in this respect), which cannot therefore provide an inventive element.

With regard to point VI
Certain documents cited

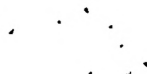
Certain documents published (rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (month/day/year)	Filing date (month/day/year)	Priority date (validity claimed) (month/day/year)
WO 00/27432	05.18.2000	11.08.1999	11.06.1998

This document reveals that the enterobacterium OmpA protein, in particular Klebsiella P40, is used as a pharmaceutical composition against cancer (see page 9, lines 1-14 and claims 21-25). This disclosure therefore appears to be prejudicial for the novelty of claims 1, 2, 6-9, 23 and 28-29 in the regional phase with the EPO.

With regard to point VII
Irregularities in the international application

1. Contrary to the requirements of rule 5.1 a) ii) PCT, the description does not indicate the relevant prior state of the art set out in documents D1-D3 and does not cite these documents.



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340646/17974	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00623	Date du dépôt international (jour/mois/année) 15/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 15/03/1999
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessin à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PC 00/00623

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
/(A61K35/74, 38:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; revendications 1-6	1-3, 6-24, 28-32
X	FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 septembre 1987 (1987-09-25) page 2, ligne 8 - ligne 13; exemples 1,3	1-3,5, 7-24, 26-32
A	FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 juin 1981 (1981-06-26) le document en entier	1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PC 00/00623

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ; YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 septembre 1991 (1991-09-05)	
E	WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ; AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 mai 2000 (2000-05-18) page 5, ligne 8 - ligne 11 page 8, ligne 29 - page 9, ligne 14 revendications 21-24	1-3, 6-24, 28-32



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00623

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2726472	A	10-05-1996	AU 714423 B	06-01-2000
			AU 4119996 A	31-05-1996
			CA 2204510 A	17-05-1996
			EP 0791063 A	27-08-1997
			WO 9614415 A	17-05-1996
			JP 10508595 T	25-08-1998
			ZA 9509416 A	06-06-1996
FR 2596064	A	25-09-1987	AT 79037 T	15-08-1992
			AU 7009387 A	24-09-1987
			DE 3780843 A	10-09-1992
			DE 3780843 T	24-12-1992
			EP 0238407 A	23-09-1987
			ES 2051759 T	01-07-1994
			GR 3005567 T	07-06-1993
			JP 1124396 A	17-05-1989
FR 2471785	A	26-06-1981	AT 5797 T	15-01-1984
			AU 538896 B	30-08-1984
			AU 6558880 A	25-06-1981
			CA 1181703 A	29-01-1985
			DE 3066115 D	16-02-1984
			EP 0031285 A	01-07-1981
			ES 498476 D	16-11-1981
			ES 8200229 A	16-01-1982
			WO 8400688 A	01-03-1984
			JP 56123918 A	29-09-1981
			US 4389396 A	21-06-1983
			ZA 8007985 A	27-01-1982
WO 9112813	A	05-09-1991	AU 7477791 A	18-09-1991
WO 0027432	A	18-05-2000	FR 2785542 A	12-05-2000



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification⁷: A61K 35/74, 39/39, A61P 37/04, 35/00, C07K 14/26 // (A61K 35/74, 38:19)	A1	(11) International publication number: WO 00/54790 (43) International publication date: 21 September 2000 (21.09.00)
(21) International application number: PCT/FR00/00623 (22) International filing date: 15 March 2000 (15.03.00) (30) Data relating to the priority: 99/03,154 15 March 1999 (15.03.99) FR (71) Applicant (for all designated States except US): PIERRE FABRE MÉDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): LIBON, Christine [FR/FR]; 9, avenue de Ternier, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). CORVAIA, Nathalie [FR/FR]; 32, rue des Chênes, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève (FR). BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). (74) Representatives: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Designated states: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published With the International Search Report.
<p style="text-align: center;">As printed</p> <p>(54) Title: IMMUNOSTIMULANT BACTERIAL MEMBRANE FRACTIONS IN CANCER TREATMENT</p> <p>(54) Titre: FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of a membrane fraction of gram-negative bacteria, in particular <i>Klebsiella pneumoniae</i> for preparing a pharmaceutical composition that is immunostimulant and/or capable of inducing an antitumoral immune response, designed in particular for treating and preventing cancers. The invention further comprises methods for preparing said membrane fractions and pharmaceutical compositions containing them, in particular combined with anticancer compounds.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, destinée en particulier au traitement et à la prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anticancéreux.</p>		

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/FR 00/00623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
//(A61K35/74,38:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 May 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; claims 1-6	1-3, 6-24, 28-32
X	FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 September 1987 (1987-09-25) page 2, line 8 - line 13; examples 1,3	1-3,5, 7-24, 26-32
A	FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 June 1981 (1981-06-26) the whole document -/-	1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2000

Date of mailing of the international search report

14/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIO

SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00623

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ;YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 September 1991 (1991-09-05) -----	
E	WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ;AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 May 2000 (2000-05-18) page 5, line 8 - line 11 page 8, line 29 -page 9, line 14 claims 21-24 -----	1-3, 6-24, 28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 00/00623

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2726472	A	10-05-1996	AU 714423 B	06-01-2000
			AU 4119996 A	31-05-1996
			CA 2204510 A	17-05-1996
			EP 0791063 A	27-08-1997
			WO 9614415 A	17-05-1996
			JP 10508595 T	25-08-1998
			ZA 9509416 A	06-06-1996
FR 2596064	A	25-09-1987	AT 79037 T	15-08-1992
			AU 7009387 A	24-09-1987
			DE 3780843 A	10-09-1992
			DE 3780843 T	24-12-1992
			EP 0238407 A	23-09-1987
			ES 2051759 T	01-07-1994
			GR 3005567 T	07-06-1993
			JP 1124396 A	17-05-1989
FR 2471785	A	26-06-1981	AT 5797 T	15-01-1984
			AU 538896 B	30-08-1984
			AU 6558880 A	25-06-1981
			CA 1181703 A	29-01-1985
			DE 3066115 D	16-02-1984
			EP 0031285 A	01-07-1981
			ES 498476 D	16-11-1981
			ES 8200229 A	16-01-1982
			WO 8400688 A	01-03-1984
			JP 56123918 A	29-09-1981
			US 4389396 A	21-06-1983
			ZA 8007985 A	27-01-1982
WO 9112813	A	05-09-1991	AU 7477791 A	18-09-1991
WO 0027432	A	18-05-2000	FR 2785542 A	12-05-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/00623

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
//(A61K35/74,38:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; revendications 1-6	1-3, 6-24, 28-32
X	FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 septembre 1987 (1987-09-25) page 2, ligne 8 - ligne 13; exemples 1,3	1-3,5, 7-24, 26-32
A	FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 juin 1981 (1981-06-26) le document en entier	1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dossier International No

PCT/FR 00/00623

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ; YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 septembre 1991 (1991-09-05)	
E	WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ; AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 mai 2000 (2000-05-18) page 5, ligne 8 - ligne 11 page 8, ligne 29 - page 9, ligne 14 revendications 21-24	1-3, 6-24, 28-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/00623

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2726472	A	10-05-1996	AU 714423 B	06-01-2000
			AU 4119996 A	31-05-1996
			CA 2204510 A	17-05-1996
			EP 0791063 A	27-08-1997
			WO 9614415 A	17-05-1996
			JP 10508595 T	25-08-1998
			ZA 9509416 A	06-06-1996
FR 2596064	A	25-09-1987	AT 79037 T	15-08-1992
			AU 7009387 A	24-09-1987
			DE 3780843 A	10-09-1992
			DE 3780843 T	24-12-1992
			EP 0238407 A	23-09-1987
			ES 2051759 T	01-07-1994
			GR 3005567 T	07-06-1993
			JP 1124396 A	17-05-1989
FR 2471785	A	26-06-1981	AT 5797 T	15-01-1984
			AU 538896 B	30-08-1984
			AU 6558880 A	25-06-1981
			CA 1181703 A	29-01-1985
			DE 3066115 D	16-02-1984
			EP 0031285 A	01-07-1981
			ES 498476 D	16-11-1981
			ES 8200229 A	16-01-1982
			WO 8400688 A	01-03-1984
			JP 56123918 A	29-09-1981
			US 4389396 A	21-06-1983
			ZA 8007985 A	27-01-1982
WO 9112813	A	05-09-1991	AU 7477791 A	18-09-1991
WO 0027432	A	18-05-2000	FR 2785542 A	12-05-2000

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 05 JUN 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340646/17974	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00623	Date du dépôt international (jour/mois/année) 15/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 15/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K35/74		
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 4 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 09/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 31.05.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Didelon, F N° de téléphone +49 89 2399 7332 

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00623

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-16 version initiale

Revendications, N°:

1-28 reçue(s) avec télécopie du 16/03/2001

Dessins, feuilles:

1/2,2/2 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00623

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	3-28
	Non :	Revendications	1, 2
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-28
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-28
	Non :	Revendications	

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00623

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale (clarté)

1. La revendication 1 manque de clarté au sens de l'Article 6 du PCT car elle définit l'utilisation de la combinaison fraction membranaire de bactéries à gram négatif, en particulier *Klebsiella pneumoniae*, en termes de résultat recherché ("immunostimulante", "capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale") et ne constitue pas une indication thérapeutique (voir les Directives relatives à l'examen, C-III 4.7).
A l'inverse, l'utilisation de cette fraction membranaire doit se rapporter à une application thérapeutique clairement délimitée (par exemple selon les revendications 22 et 23).

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Remarques préliminaires:

Les modifications déposées avec le téléfax du 16 mars 2001 sont recevables et ne s'étendent pas au-delà de la demande telle que déposée.

Ces modifications incluent la caractérisation des fractions membranaires de bactéries gram-négatif comprenant des protéoglycannes. Cette caractéristique était déjà présente implicitement, étant bien entendu que les membranes bactériennes fractionnées comportent de telles molécules. De plus la présente demande ne démontre en aucune façon que les protéoglycannes sont le composé actif pour l'immunostimulation. Il apparaît plutôt d'après l'art antérieur que la protéine P40 soit elle-même l'immunostimulant.

2. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 726 472 (PF MÉDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10)

D2: FR-A-2 471 785 (PF MÉDICAMENT), 21 Décembre 1979 (1979-12-21)

D3: FR-A-2 596 064 (PF MÉDICAMENT) 25 septembre 1987 (1987-09-25)

3. L'objet des revendications 1 et 2 n'est pas considéré comme nouveau dans le sens de l'Article 33(2) PCT.

3.1 Le document D1 révèle que la protéine OmpA P40 issue de membranes de bactéries du genre *Klebsiella* agit seule comme agent immunostimulant en particulier provoquant une réponse immunitaire cellulaire sur les lymphocytes Th1 et surtout en activant les macrophages (voir D1, page 1, ligne 1-3; page 17, exemple 5, 1.b et 1.3 ; revendications 1-6). De plus, cette protéine en elle-même constitue une fraction membranaire, ce qui est également envisagé dans la présente demande (voir page 3, lignes 29 - page 4, lignes 1-2). Même si cette protéine est envisagée dans D1 comme adjuvant, cela n'enlève rien à son effet immunostimulant comme démontré dans l'exemple 5 cité.

Au vu de cette divulgation, les revendications 1-2 ne semblent donc pas nouvelles.

4. L'objet des revendications 1-28 n'implique pas d'activité inventive et ne remplit pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

4.1 Il n'apparaît pas clairement quel problème technique se doit de résoudre la revendication 3, qui ne semble donc pas apporter d'élément inventif.

4.2 Les revendications 4 et 5 sont dirigées vers l'utilisation de fractions membranaires obtenues selon deux procédés différents, et les revendications 25-27 cherchent à protéger les dits procédés.

Cependant ces procédés, utilisés dans la revendication 4 est un procédé courant d'isolement de membranes utilisé en laboratoire (centrifugation, chauffage, traitement avec une enzyme protéolytique, puis lavages et enfin sonication). Ce procédé est également décrit dans D2 pour l'extraction de ribosomes (voir page 2, ligne 19- page 4, ligne 7)

Le procédé utilisé dans la revendication 5 quant à lui est déjà décrit dans D3, exemple 1.

Par conséquent, une composition pharmaceutique ou bien l'utilisation d'une fraction membranaire selon les procédés décrits (revendications 24, 25 et 3, 4 respectivement) ne comportent pas d'activité inventive, l'homme du métier connaissant ceux-ci les auraient utilisés comme alternative évidente afin d'obtenir des fractions membranaires contenant la protéine P40, responsable de l'effet immunostimulant.

- 4.3 Les agents qui véhiculent ladite fraction membranaire ou bien qui régulent les réponse immunitaire selon les revendications 6-16 représentent des solutions tout à fait évidentes dans le but d'une meilleure la stabilité et améliorer la capacité immunostimulante de la préparation de la présente demande.
- 4.4 Les revendications 17-23 et 26-28 ont trait à la juxtaposition d'un traitement anticancéreux à l'administration de la fraction membranaire de la présente demande. Ceci constitue simplement un traitement anticancéreux classique additionnel sans aucun effet synergique démontré (aucun exemple n'est fourni à cet égard) qui ne peut donc apporter d'élément inventif.

Concernant le point VI

Certains documents cités

Certains documents publiés (règle 70.10)

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
WO 00/27432	18.05.2000	08.11.1999	06.11.1998

Ce document révèle que la protéine OmpA d'entérobactérie, en particulier la P40 de Klebsiella, est utilisée comme composition pharmaceutique contre le cancer (voir page 9, lignes 1-14 et revendications 21-25). Cette divulgation apparaît donc comme préjudiciable pour la nouveauté des revendications 1, 2, 6-9, 23, 28-29 en phase régionale auprès de l'OEB.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1-D3 et ne cite pas ces documents.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif
comprenant des protéoglycannes pour la préparation d'une composition
5 pharmaceutique immunostimulante, et/ou capable d'induire une réponse immunitaire
antitumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la fraction
membranaire comprend une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.

3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la
10 fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches
différentes de bactéries.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que
la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 15 a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance
suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à
l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques
du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans
20 une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes
protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution
physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- 25 f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que
la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance
suivie 1 cas échéant d'une centrifugation ;
- 30 b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une
décongélation et du séchage des cellules ;

- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).
- 6/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité d'induire une réponse immunitaire antitumorale.
- 7/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit agent est de type émulsion huile dans eau ou eau dans huile.
- 8/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit agent est sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.
- 9/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.
- 10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est une cytokine.
- 11/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les hormones.

12/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les facteurs de croissance.

5 13/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un composé cellulaire.

14/ Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un acide nucléique choisi parmi les ADN et les ARN.

10 15/ Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un composé de la famille des ribosomes.

16/ Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est une protéine de la famille des protéines de choc thermique.

15 17/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux.

18/ Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le traitement anticancéreux est une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

20 19/ Utilisation selon l'une des revendications 17 et 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

20/ Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie entérale ou parentérale.

25 21/ Utilisation selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

22/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 21, pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

30 23/ Utilisation selon la revendication 22, pour la prévention et/ou le traitement des cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie et des mélanomes malins.

24/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire de bactéries à gram négatif comprenant des protéoglycannes susceptibles d'être obtenus par un procédé de préparation d'une fraction membranaire tel que décrit dans la revendication 4 ou 5.

5 25/ Composition pharmaceutique selon la revendication 24, caractérisée en ce que ladite bactérie à gram négatif est *Klebsiella pneumoniae*.

26/ Composition pharmaceutique selon la revendication 24 ou 25, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

10 27/ Composition pharmaceutique selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

28/ Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que ledit composé anticancéreux est choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou
15 parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.



CLAIMS

- 1/ The use of a membrane fraction of Gram-negative
bacteria for preparing an immunostimulant
5 pharmaceutical composition capable of inducing an
antitumor immune response.
- 2/ The use as claimed in claim 1, characterized in
that the membrane fraction comprises a membrane
10 fraction of *Klebsiella pneumoniae*.
- 3/ The use as claimed in claim 1 or 2, characterized
in that the membrane fraction comprises at least
15 membrane fractions of two different strains of
bacteria.
- 4/ The use as claimed in one of claims 1 to 3,
characterized in that the membrane fraction is
20 prepared using a method comprising the following
steps:
- a) culturing of said bacteria in a culture medium
which allows their growth, followed by
centrifugation of said culture;
 - 25 b) where appropriate, deactivation of the lytic
enzymes of the bacterial pellet obtained in
step a), then centrifugation of the suspension
obtained;
 - c) 30 extraction and elimination of the non-membrane-
bound proteins and of the nucleic acids of the
pellet obtained in step a) or b) with at least
one cycle of washing the pellet in an
extraction solution;
 - d) 35 digestion of the membrane pellet obtained in
step c) in the presence of protease enzymes,
followed by centrifugation;
 - e) at least one cycle of washing the pellet
obtained in step d) in a physiological solution
and/or in distilled water; and

f) ultrasonication of the pellet obtained in step e).

5/ The use as claimed in one of claims 1 to 3,
5 characterized in that the membrane fraction is prepared using a method comprising the following steps:

- 10 a) culturing of said bacteria in a culture medium which allows their growth, followed, where appropriate, by centrifugation;
- b) freezing of the culture medium or of the pellet obtained in step a), followed by thawing and drying of the cells;
- 15 c) elimination, using a DNase, of the nucleic acids from the dried cells obtained in step b), which have been resuspended;
- d) grinding of the cells obtained in step c) and clarification of the suspension obtained;
- 20 e) precipitation, in acid medium, of the suspension obtained in step d) and elimination of the pellet;
- f) neutralization of the supernatant obtained in step e) containing the membrane suspension,
25 followed by dialysis and concentration of the membrane suspension; and
- g) sterilization of the concentrated membrane suspension obtained in step f).

30 6/ The use as claimed in claim 2, characterized in that the membrane fraction is the *Klebsiella pneumoniae* P40 protein of sequence SEQ ID No. 2, a fragment thereof or a protein, the sequence of which exhibits a percentage identity of at least
35 80% with the sequence SEQ ID No. 2.

7/ The use as claimed in one of claims 1 to 6, characterized in that the pharmaceutical composition also comprises an agent for vehiculing

said membrane fraction in a form which makes it possible to improve its stability and/or its immunostimulant activity and/or its capacity to induce an antitumor immune response.

5

8/ The use as claimed in claim 7, characterized in that said agent is of the oil-in-water or water-in-oil emulsion type.

10

9/ The use as claimed in claim 7, characterized in that said agent is in the form of a particle of the liposome, microsphere or nanosphere type, or any type of structure which enables said membrane fraction to be encapsulated and presented in particulate form.

15

10/ The use as claimed in one of claims 1 to 9, characterized in that the pharmaceutical composition also comprises an agent for potentiating the immunostimulant activity and/or the antitumor immune response of said membrane fractions.

20

11/ The use as claimed in claim 10, characterized in that the agent for potentiating the immunostimulant activity and/or the antitumor immune response of said membrane fractions is a cytokine.

25

12/ The use as claimed in claim 10, characterized in that the agent for potentiating the immunostimulant activity and/or the antitumor immune response of said membrane fractions is a regulatory agent chosen from hormones.

30

35

13/ The use as claimed in claim 10, characterized in that the agent for potentiating the immunostimulant activity and/or the antitumor

immune response of said membrane fractions is a regulatory agent chosen from growth factors.

- 5 14/ The use as claimed in claim 10, characterized in that the agent for potentiating the immunostimulant activity and/or the antitumor immune response of said membrane fractions is a cellular compound.
- 10 15/ The use as claimed in claim 14, characterized in that said cellular compound is a nucleic acid chosen from DNAs and RNAs.
- 15 16/ The use as claimed in claim 14, characterized in that said cellular compound is a compound of the ribosome family.
- 20 17/ The use as claimed in claim 14, characterized in that said cellular compound is a protein of the heat-shock protein family.
- 25 18/ The use as claimed in one of claims 1 to 17, for preparing a pharmaceutical composition intended to be administered in combination with an anticancer treatment.
- 30 19/ The use as claimed in claim 18, characterized in that the anticancer treatment is chemotherapy and/or radiotherapy.
- 35 20/ The use as claimed in either of claims 18 and 19, for preparing a pharmaceutical composition intended to be administered simultaneously with, separately from or spread out over time with the anticancer treatment.
- 21/ The use as claimed in claim 20, characterized in that the pharmaceutical composition is administered via the enteral or parenteral route.

- 22/ The use as claimed in one of claims 18 to 21,
characterized in that said combined anticancer
treatment is a chemotherapeutic treatment
comprising a protease inhibitor or a compound with
anti-angiogenic activity.
- 23/ The use as claimed in one of claims 1 to 22, for
preventing and/or treating cancers.
- 24/ The use as claimed in claim 23, for preventing
and/or treating bladder cancers, prostate cancers,
colon cancers, liver cancers and malignant
melanomas.
- 25/ A method for preparing a membrane fraction of
Gram-negative bacteria, characterized in that it
comprises the following steps:
- a) culturing of said bacteria in a culture medium
which allows their growth, followed by
centrifugation of said culture;
 - b) where appropriate, deactivation of the lytic
enzymes of the bacterial pellet obtained in
step a), then centrifugation of the suspension
obtained;
 - c) extraction and elimination of the non-membrane-
bound proteins and of the nucleic acids of the
pellet obtained in step a) or b) with at least
one cycle of washing the pellet in an
extraction solution;
 - d) digestion of the membrane pellet obtained in
step c) in the presence of protease enzymes,
followed by centrifugation;
 - e) at least one cycle of washing the pellet
obtained in step d) in a physiological solution
and/or in distilled water; and
 - f) ultrasonication of the pellet obtained in step
e).

26/ A method for preparing a membrane fraction of Gram-negative bacteria, characterized in that it comprises the following steps:

- 5 a) culturing of said bacteria in a culture medium which allows their growth, followed, where appropriate, by centrifugation;
- b) freezing of the culture medium or of the pellet obtained in step a), followed by thawing and
- 10 drying of the cells;
- c) elimination, using a DNase, of the nucleic acids from the dried cells obtained in step b), which have been resuspended;
- d) grinding of the cells obtained in step c) and
- 15 clarification of the suspension obtained;
- e) precipitation, in acid medium, of the suspension obtained in step d) and elimination of the pellet;
- f) neutralization of the supernatant obtained in
- 20 step e) containing the membrane suspension, followed by dialysis and concentration of the membrane suspension; and
- g) sterilization of the concentrated membrane suspension obtained in step f).

25

27/ The method as claimed in claim 25 or 26, characterized in that said Gram-negative bacterium is *Klebsiella pneumoniae*.

30 28/ A membrane fraction which can be obtained using a method as claimed in one of claims 25 to 27.

29/ A pharmaceutical composition comprising a membrane fraction as claimed in claim 28.

35

30/ A pharmaceutical composition comprising a membrane fraction of a Gram-negative bacterium, in particular of *Klebsiella pneumoniae*, or a pharmaceutical composition as claimed in claim 29,

characterized in that it is combined with an anticancer treatment by chemotherapy and/or by radiotherapy.

5 31/ The pharmaceutical composition as claimed in claim
30, characterized in that it contains an anticancer compound as a combination product for use which is simultaneous, separate or spread out over time.

10

32/ The pharmaceutical composition as claimed in claim
30, characterized in that said anticancer compound is chosen from protease inhibitors or from compounds with anti-angiogenic activity.

Translation
09/936677

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

JAN 07 2000

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference 340646/17974	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00623	International filing date (day/month/year) 15 March 2000 (15.03.00)	Priority date (day/month/year) 15 March 1999 (15.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/74, 39/39, A61P 37/04, 35/00, C07K 14/26, A61K 35/74		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 October 2000 (09.10.00)	Date of completion of this report 31 May 2001
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

International application No.

I. Basis of the report

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-16, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____
 pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-28, filed with the letter of 16 March 2001 (16.03.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____

☒ the drawings, sheets/fig 1/2,2/2 , as originally filed,
 sheets/fig _____ , filed with the demand,
 sheets/fig _____ , filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____ , filed with the letter of _____.

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

Form PCT/IPEA/409 (Box I) (January 1994)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00623**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3-28	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-28	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. Preliminary observations:**

The amendments submitted with the facsimile dated 16 March 2001 are admissible and do not extend beyond the content of the application as filed.

Said amendments include the characterisation of proteoglycan-containing gram-negative bacteria membrane fractions. Said feature was already implicitly present, as it was understood that the fractionated bacterial membranes comprise such molecules. Moreover, the present application does not in any way demonstrate that said proteoglycans are the active compound for achieving immunostimulation. From the prior art, it would appear, rather, that the protein P40 itself has immunostimulatory properties.

2. Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 726 472 (PF MEDICAMENT) 10 May 1996
(1996-05-10)

D2: FR-A-2 471 785 (PF MEDICAMENT), 21 December 1979
(1979-12-21)

D3: FR-A-2 596 064 (PF MEDICAMENT) 25 September 1987
(1987-09-25)

3. The subject matter of Claims 1 and 2 is not considered novel under the terms of PCT Article 33(2).

3.1 Document D1 discloses that the protein OmpA P40, obtained from membranes of bacteria of the *Klebsiella* genus, acts by itself as an immunostimulant, in particular by generating a cellular immune response on Th1 lymphocytes and especially by activating macrophages (see D1, page 1, lines 1-3; page 17, example 5, 1.b and 1.3; Claims 1-6). Moreover, said protein itself is a membrane fraction, which is also considered in the present application (see page 3, lines 29 to page 4, lines 1-2). Even if said protein is considered as an adjuvant in D1, this does not in any way negate its immunostimulatory effect, as shown in Example 5, which is cited.

In view of said disclosure, Claims 1-2 do not therefore appear to be novel.

4. The subject matter of Claims 1-28 does not involve an inventive step and does not fulfil the requirements of PCT Article 33(3).

4.1 The technical problem that Claim 3 aims to solve does not appear clearly; it does not therefore contribute to the inventiveness of the subject matter.

4.2 Claims 4 and 5 are directed to the use of membrane fractions obtained by means of two different methods, and Claims 25-27 aim to protect said methods.

However the method used in Claim 4 is a standard method used in laboratories for isolating membranes (centrifuging, heating, proteolytic enzyme treatment followed by rinsing and finally sonication). Said method is also described in D2, in which it is used to extract ribosomes (see page 2, line 19 to page 4, line 7).

As for the method used in Claim 5, it is already described in D3, example 1.

Consequently, a pharmaceutical composition, or the use of a membrane fraction according to the methods described (Claims 24, 25 and 3, 4 respectively), do not involve an inventive step, since a person skilled in the art, aware of said methods, would have used them as an obvious alternative to obtain membrane fractions containing the protein P40, which is responsible for the immunostimulatory effect.

4.3 The solutions provided by the agents acting as carriers for said membrane fraction or regulating the immune response according to Claims 6-16, with a view to enhance stability and the immunostimulatory properties of the preparation of the present application, are quite obvious.

4.4 Claims 17-23 and 26-28 relate to the association of a cancer treatment with the delivery of the membrane fraction of the present application. This measure simply amounts to an additional cancer treatment without any synergistic effect being shown (no

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00623

example is provided in this regard), and therefore, cannot contribute to the inventiveness of the subject matter.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00623**Supplemental Box**
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.

WO 00/27432 18.05.2000 08.11.1999 06.11.1998

Said document discloses that the protein OmpA of enterobacteria, in particular the protein P40 of Klebsiella, is used as a pharmaceutical composition to treat cancers (see page 9, lines 1-14 and Claims 21-25). This disclosure therefore will be prejudicial to the novelty of Claims 1, 2, 6-9, 23, 28-29 upon entering the regional phase at the EPO.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00623

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not outline the relevant prior art set forth in documents D1-D3 and does not cite these documents.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00623

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 1 lacks clarity under PCT Article 6, since it defines the use of the gram-negative bacteria membrane fraction combination, in particular from *Klebsiella pneumoniae*, in terms of the result to be achieved ("immunostimulatory", "capable of inducing an antitumoral immune response") and does not constitute a therapeutic indication (see PCT Guidelines, Chapter III-4.7).

Conversely, the use of said membrane fraction must relate to a clearly delimited therapeutic use (e.g. as per Claims 22 and 23).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 novembre 2000 (01.11.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00623	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340646/17974
Date du dépôt international (jour/mois/année) 15 mars 2000 (15.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 15 mars 1999 (15.03.99)
Déposant LIBON, Christine etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

09 octobre 2000 (09.10.00)



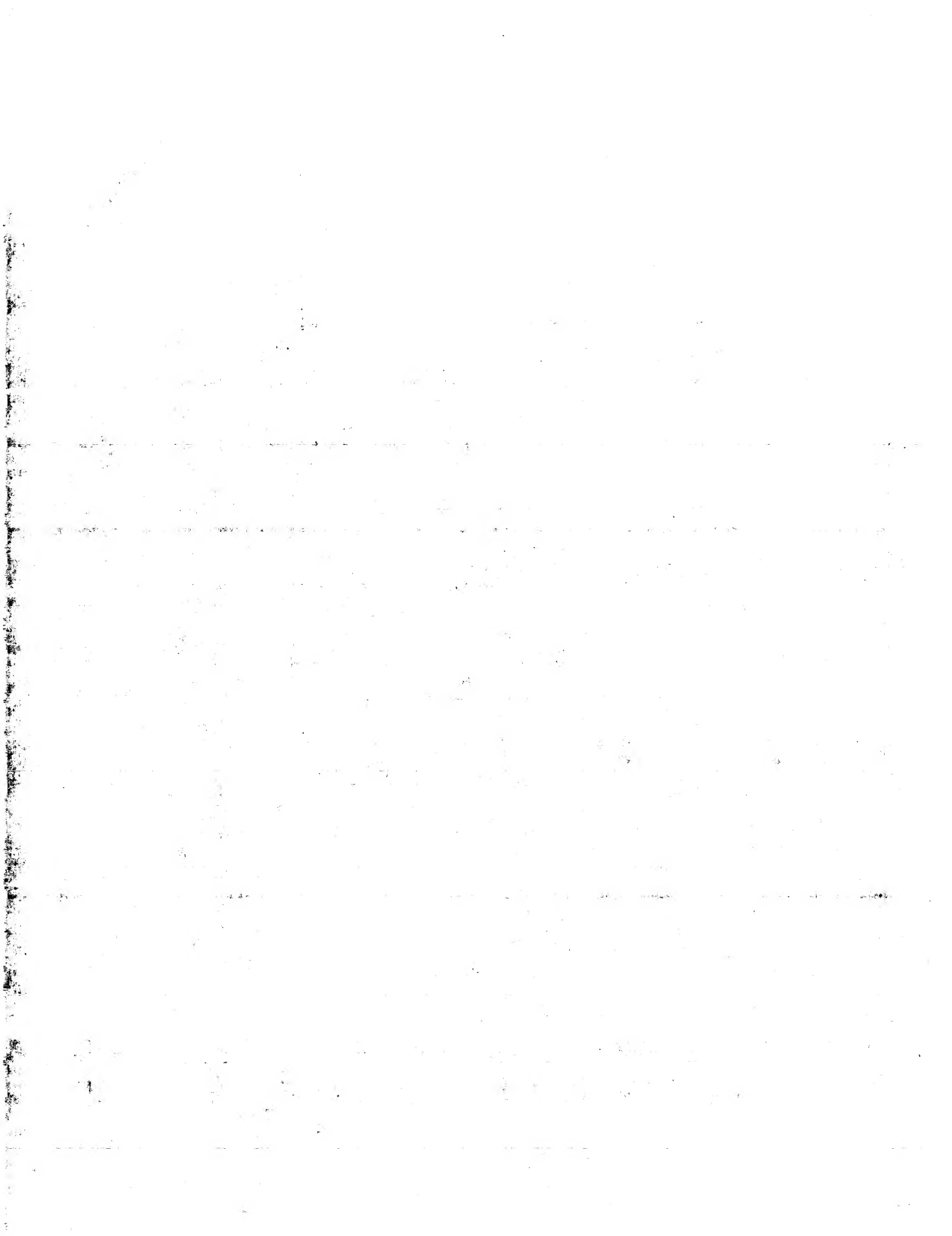
dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Maria Kirchner no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	---



PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/54790
PCT/FR00/00623
From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Régimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)		
Applicant's or agent's file reference 340646/17974		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/FR00/00623	International filing date (day/month/year) 15 March 2000 (15.03.00)	Priority date (day/month/year) 15 March 1999 (15.03.99)
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT etc		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:
BR,CA,CN,EP,JP,MX, ZA

Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1)a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

21 September 2000 (21.09.00) under No. WO/ 00/54790

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22)338.83.38</p>
---	--

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Régimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 mars 2001 (29.03.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340646/17974	
Demande internationale no PCT/FR00/00623	Date du dépôt international (jour/mois/année) 15 mars 2000 (15.03.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant ☐ l'inventeur ☒ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 45 00 92 02	
	no de télécopieur 01 45 00 46 12	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Régimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 44 29 35 00	
	no de télécopieur 01 44 29 35 99	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Kari Huynh-Khuong no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

